

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09634

研究課題名(和文) 染色体高次構造調節因子 CTCF の子宮体癌における下流因子の探索

研究課題名(英文) Exploration of CTCF downstream targets in endometrial cancer

研究代表者

後藤 理 (GOTOH, Osamu)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がんゲノム研究部・研究員

研究者番号：00634891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CTCF の変異は子宮体癌を含む数種のがん種で報告されており、ハプロ不全性を示す腫瘍抑制遺伝子であることが知られている。しかし、そのがん化における役割は不明であった。CTCF/Cohesin 結合領域および転写因子結合領域のメチル化の状態を、CTCF変異型および野生型の子宮体癌検体と比較したところ、CTCFに変異を有する子宮体癌において、CTCF/Cohesin 結合領域とESR1、FOXA2等の転写因子結合領域のメチル化が亢進していることが明らかとなり、クロマチン構造制御の異常を伴ったエストロゲンを含む性ホルモン受容体による転写制御の異常が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体高次構造調節因子 CTCF の変異により、類内膜性子宮体癌のがん化が引き起こされる機序を明らかにすることを目的として研究を行った。CTCFの下流因子を、特にエストロゲンシグナルに注目して探索したところ、クロマチン構造制御の異常を伴ったエストロゲンを含む性ホルモン受容体による転写制御の異常を示唆する結果を得た。本研究により子宮体癌の新たなホルモン療法の開発や、染色体高次構造を標的とした治療薬への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：CTCF mutations have been reported in several cancer types, including endometrial cancer, and it is known to be a tumor suppressor gene associated with haploinsufficiency. However, its specific role in cancer development has remained unclear. By comparing the methylation status of CTCF/Cohesin binding regions and transcription factor binding regions in CTCF-mutant and wild-type endometrial cancer samples, we found that CTCF-mutant endometrial cancer exhibited hypermethylation in CTCF/Cohesin binding regions as well as in transcription factor binding regions such as ESR1 and FOXA2. This suggests aberrant transcriptional control mediated by hormone receptors with disrupted chromatin structure regulation in endometrial cancer with CTCF mutations.

研究分野：がんゲノム学

キーワード：エピゲノム解析 ゲノム解析 婦人科腫瘍学

### 1. 研究開始当初の背景

CTCF (CCCTC-binding factor) は、11 個のジンクフィンガーを持つ 82-kDa の DNA 結合タンパク質であり、インスレータなどの遺伝子発現調節領域に結合し、多数の遺伝子の発現を制御する。近年、Hi-C (High-throughput chromosome conformation capture) や ChIA-PET (Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing) など、クロマチン構造を解析する手法が目覚ましく発達したことにより、CTCF が TAD (topologically associated domain) と呼ばれる転写調節ドメインを形成し、一定の領域ごとに転写制御を行なっていることや、ユークロマチンとヘテロクロマチンの領域を区切る境界として機能することが分かってきた。

CTCF の変異は子宮体癌を含む数種のがん種で報告されており、ハプロ不全性を示す腫瘍抑制遺伝子であることが知られている。類内膜性子宮体癌では、エストロゲンシグナルがその増殖に重要な役割を果たしていることが知られているが、申請者らは、これまでの研究過程で、CTCF 変異が、エストロゲンシグナル伝達に重要な *ESR1*、*FOXA2* および *ZFH3* の変異と相互排他性を示すことを見出した。特に、CTCF 変異を有する症例では、エストロゲン下流遺伝子の発現が有意に低下していた。しかし、子宮体癌において、CTCF 変異ががん細胞の増殖をどのようにドライブしているのかその機序は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、染色体高次構造調節因子 CTCF の変異により、類内膜性子宮体癌のがん化が引き起こされる機序を明らかにすることである。本研究では、CTCF の下流因子を、特にエストロゲンシグナルに注目して探索し、CTCF 変異による類内膜性子宮体癌の増殖機序を明らかにし、子宮体癌の新たなホルモン療法の開発や、染色体高次構造を標的とした治療薬への展開を目指す。

### 3. 研究の方法

類内膜性子宮体癌 69 症例のエクソーム/トランスクリプトーム/メチロームデータを用いて研究を行った。エクソーム解析では、Agilent 社 SureSelect でライブラリ調製し、Illumina 社 HiSeq2000 でシーケンスしたデータを用いた。SNV 検出は、MuTect / VarScan / Karkinos を用いた。Indel 検出は、VarScan / Karkinos / SomaticIndelDetector を用いた。コピー数解析は、EXCAVATOR および GISTIC を用いた。DNA メチローム解析では、Illumina 社 MethylationEPIC Array で解析したデータを用いた。メチル化の程度を示す  $\beta$  値の計算は GenomeStudio ソフトウェアを用いた。トランスクリプトーム解析では、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array で解析したデータを用いた。

### 4. 研究成果

DNA メチロームを中心としたオミックス解析を行った。CTCF 結合部位のメチル化状態を、CTCF 変異型および野生型の腫瘍検体で比較したところ、CTCF に変異を有する子宮体癌では、メチル化が亢進していることが分かった (図 1)。CTCF 結合部位からの距離と CpG  $\beta$  値の関係を調べたところ、CTCF 結合部位のメチル化の亢進は約 1 Mb の範囲に及んでいることが分かった (図 2)。

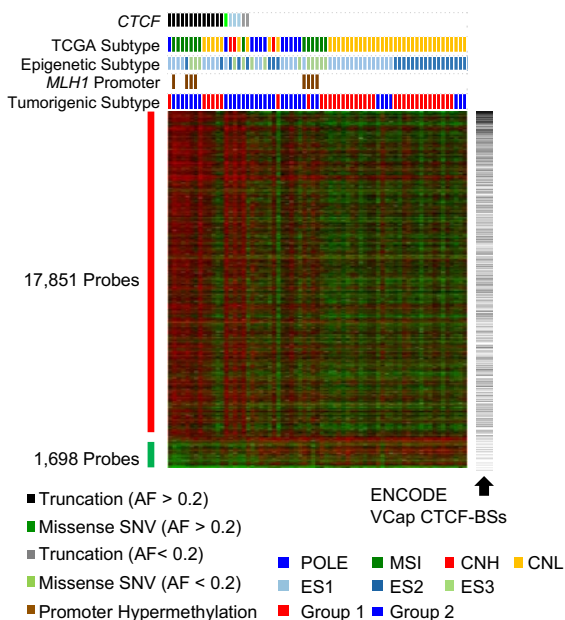


図 1: CTCF 変異陽性子宮体癌における DNA メチル化

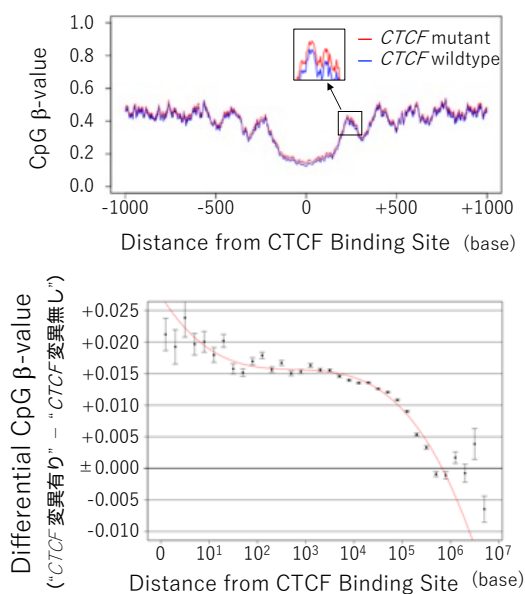
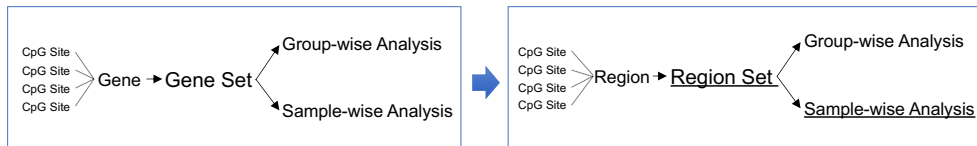


図 2: CTCF 結合部位からの距離と CpG  $\beta$  値

### 解析コンセプト



### 解析手順

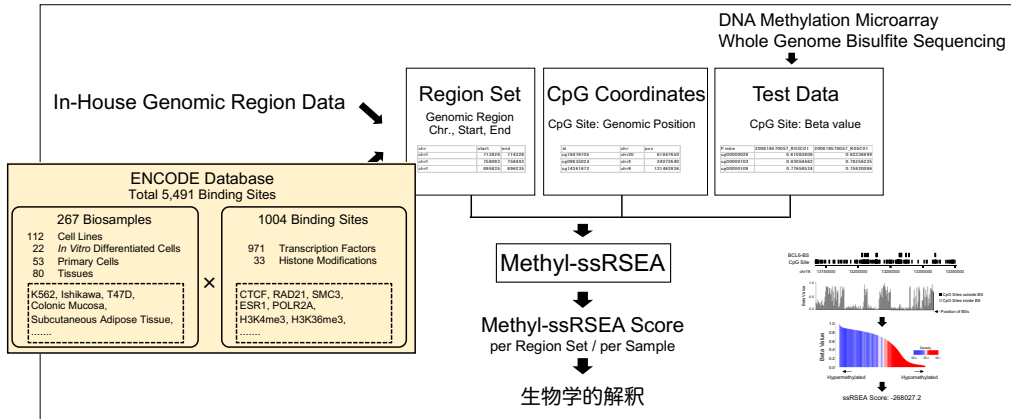


図3: Single sample region-set enrichment analysis for DNA methylome (methyl-ssRSEA)

トランスクリプトームでは、遺伝子セット解析が標準的な方法として用いられているが、DNA メチロームでは、遺伝子レベルのサマリを作るのが難しいという問題があった。そこで、DNA メチロームにおける生物学的解釈のための新しい方法論の開発を行い、転写因子結合部位などゲノム機能領域単位で解析するツール Methyl-ssRSEA を開発した (図3)。

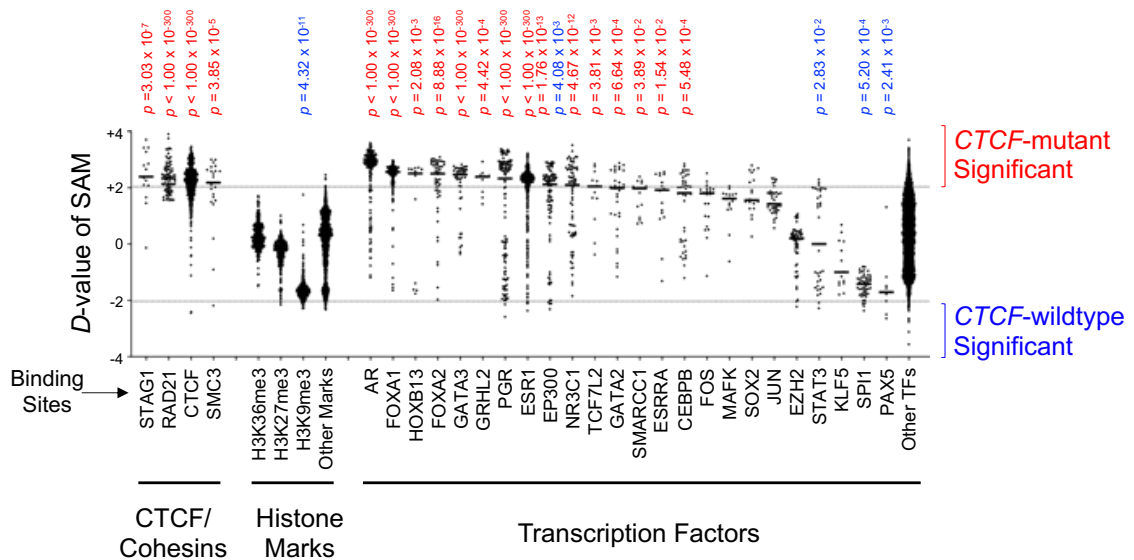


図4: CTCF 変異型と野生型の子宮体癌における ssRSEA スコア

本研究で開発した Methyl-ssRSEA を用いて、メチル化の状態を領域セット単位で解析した。CTCF 変異型および野生型の腫瘍検体で比較したところ、CTCF に変異を有する子宮体癌において、CTCF/Cohesin 結合領域と ESR1、FOXA2 等の転写因子結合領域のメチル化が亢進していることが分かった (図4)。これまでの研究により、CTCF 変異と FOXA2、ESR1 変異は相互排他的であること、また、CTCF 変異陽性子宮体がんでは、FOXA2、ZFHX3、FOXA2 ターゲット遺伝子および ER 下流因子の発現が低下していることが明らかとなっている。このことから、CTCF は FOXA2、ZFHX3、ER の上流に位置し、変異によりエストロゲン活性の低下をきたしていると考えられ、クロマチン構造制御の異常を伴ったエストロゲンを含む性ホルモン受容体による転写制御の異常が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minegishi Ryu, Gotoh Osamu, Tanaka Norio, Maruyama Reo, Chang Jeffrey T, Mori Seiichi	4. 巻 13
2. 論文標題 A method of sample-wise region-set enrichment analysis for DNA methylomics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epigenomics	6. 最初と最後の頁 1081 ~ 1093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2217/epi-2021-0065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Gotoh Osamu, Kiyotani Kazuma, Chiba Tomohiro, Sugiyama Yuko, Takazawa Yutaka, Nemoto Kensaku, Kato Kazuyoshi, Tanaka Norio, Nomura Hidetaka, Hasegawa Kosei, Fujiwara Keiichi, Takamatsu Shiro, Matsumura Noriomi, Noda Tetsuo, Mori Seiichi	4. 巻 160
2. 論文標題 Immunogenomic landscape of gynecologic carcinosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 547 ~ 556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygyno.2020.11.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 理、杉山 裕子、外岡 暁子、千葉 知宏、野田 哲生、森 誠一
2. 発表標題 子宮体癌の前駆病変・内膜増殖症におけるゲノム・エピゲノム異常
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤 理、杉山 裕子、千葉 知宏、野田 哲生、森 誠一
2. 発表標題 子宮体癌の前駆病変・内膜増殖症におけるゲノム異常
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 子宮・卵巣がん肉腫の免疫ゲノム解析
2. 発表標題 後藤 理、清谷 一馬、杉山 裕子、高澤 豊、加藤 一喜、田中 教生、野村 秀高、長谷川 幸清、藤原 恵一、高松 士朗、松村 謙臣、野田 哲生、森 誠一
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	丸山 玲緒  (MARUYAMA Reo)  (60607985)	公益財団法人がん研究会・がん研究所 がんエピゲノムプロジェクト・プロジェクトリーダー   (72602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------